干旱条件下 DCMU 对高表达转 C_4-*pepc* 水稻的花青素合成基因及其相关信号的影响

何亚飞[1,2];许梦洁[1,3];李霞

(1). 江苏省农业科学院粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心/国家水稻改良中心南京分中心 南京 210014; (2). 南京林业大学生物与环境学院 南京 210037; (3). 南京晓庄学院 南京 211171

摘 要: 为了揭示高表达转玉米 C_4-磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC, EC 4.1.1.31)基因水稻(PC)在耐旱中光合与花青素调节途径的内在联系，本研究以 PC 和未转基因野生型原种(WT)的水培苗为试验材料，在 4~5 叶期，通过 50 μmol·L^{-1} 光合抑制剂 DCMU[3-(3',4'-dich-lorophenyl)-1,1-dimethyl µrea]预处理 1 h，观察在 12% PEG-6000 模拟干旱处理下的表现。结果表明，在模拟干旱条件下，DCMU 预处理使两种供试材料相对含水量显著下降，且 PC 相对含量显著高于 WT; PC 水稻中始终伴随着较高的花青素含量。从光合数据来看，与单独 12% PEG-6000 处理相比，DCMU 联合 12% PEG-6000 处理显著抑制了两种水稻材料的净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 含量及羧化效率，但 PC 的各指标显著高于 WT。同时，DCMU 联合 12% PEG-6000 处理显著下调两种供试材料的内源蔗糖含量，但 PC 中蔗糖含量显著高于 WT。进一步研究发现 PC 中更高的蔗糖含量与花青素合成有关转录因子 *bHLH(OsB1, OsB2), R2R3-MYB(OsC1), COP1*(Constitutively photomorphogenic 1), *HY5*(Elongated hypocotyl 5)更高的转录水平同步，下游花青素合成相关基因 *OsPAL, OsCHI, OsCHS, OsF3H, OsF3'H, OsDFR, OsANS* 的表达量增加。此外，PC 水稻可能通过诱导 NO 和 Ca^{2+}感受干旱信号，参与转录因子的调节，进而参与花青素合成基因的调控，合成较多的花青素，增强 PC 水稻对干旱逆境的响应，增强保水能力，最终表现耐旱。

关键词: 水稻; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 蔗糖; 花青素; DCMU; 干旱

中图分类号: S18

Effects of DCMU on anthocyanin synthetic genes and its related signals in transgenic rice lines with over expression of C_4-*pepc* under drought conditions*

HE Yafei[1,2], XU Mengjie [1,3], LI Xia[1**]

(1. Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu High Quality Rice Engineering Technology Research Center, the National Center for Rice Improvement Center Nanjing Branch, Nanjing 210014, China; 2. College of Biology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China)

Abstract: Anthocyanins are important antioxidant molecules that help protect plants from reactive oxygen species (ROS) damage. Especially under adversity conditions, the regulation of Suc in plants depends on its ability to induce the accumulation of anthocyanins. To reveal the intrinsic relationship between photosynthetic and anthocyanin-regulated pathways of the over-expressing maize C_4-phosphoenolpyruvate carboxylate (PEPC, EC 4.1.1.31) gene rice (PC) in drought tolerance, PC and untransformed wild-type (WT) acted as materials, were treated with 50 μmol·L^{-1} photosynthetic inhibitor DCMU for 1h, and the performance of the rice seedlings in the 4-5 leaf stage was observed under 12% PEG-6000 simulated drought treatment. The results showed that the relative water content of WT and PC was significantly reduced under DCMU treatment, and PC was significantly higher than WT under 12% PEG-6000 simulated drought treatment, which was accompanied by the higher anthocyanin content in PC lines. From the photosynthetic data, compared with 12% PEG-6000 alone, DCMU combined with 12% PEG-6000 significantly inhibited the net photosynthetic rate, stomatal conductance, intercellular CO_2 and carboxylation efficiency of the two rice lines, but the PC lines was significantly higher than WT. Meanwhile, DCMU combined with 12% PEG-6000 treatment down-regulated the content of endogenous sucrose in the two materials, but the sucrose content in PC lines was significantly higher than that in WT. Further studies showed that higher sucrose levels in PC were associated with higher levels of transcription with, *bHLH*(*OsB1*, *OsB2*), *R2R3-MYB*(*OsC1*), *COP1*(Constitutively photomorphogenic 1), *HY5*(Elongated hypocotyl 5), *OsPAL*, *OsCHI*, *OsCHS*, *OsF3H*, *OsF3'H*, *OsDFR*, *OsANS* to synthesize more anthocyanin, it can synthesize more anthocyanins to enhance water retention capacity. In addition, PC rice can sense drought signals through NO and Ca^{2+}, which involved in the regulation of transcription factors, and then participate in the regulation of anthocyanin synthesis gene, synthesis of more anthocyanin, thereby enhancing the response of PC rice under drought stress to enhance the water retention capacity, keep the photosynthetic capacity stable and finally bear drought. Therefore, it is beneficial in the molecular breeding of "C_4 Rice" and the study the symphony between high yield and resistance in plants to open a new vision.

Keywords: *Oryza sativa* L.; Phosphoenolpyruvate carboxlase; Sucrose; Anthocyanin; DCMU; Drought

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作物之一。而干旱严重制约着作物，尤其是水稻的生长和发育，降低其产量[1]。而且，近年来全球干旱呈加重趋势，因此，从多角度解析水稻的耐旱机理成为现代农业生物学研究的热点之一。C_4植物如玉米(*Zea mays*)在干旱等逆境条件下表现较高的光合效率和水分利用率，进而表现一定的抗逆性，维持作物产量[2]。因此，科学家们一直希望将C_4植物中的关键基因转入C_3植物水稻中，提高水稻光合效率和耐逆性，增加产量，保证世界粮食安全[3]。玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, EC 4.1.1.31)是C_4植物光合途径中的关键酶。PEPC不仅在提高C_4光合效率中起关键作用，并且在耐旱性方面也扮演着重要的角色[4]。现已通过基因工程技术获得高表达转玉米C_4-*pepc*基因水稻(PC)[5-6]。众多研究表明PC水稻不仅表现出较强的光合能力和较高的产量[7-10]，而且表现耐旱以及耐低氮特性[11-15]。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶参与植物光合作用中的碳固定以及三羧酸循环中的碳回补功能，大量研究发现在各种生物胁迫和非生物胁迫下PEPC活性增加，这有可能来源于基因的转录水平、蛋白质合成或蛋白质磷酸化水平的增加[16]。转玉米C_4型*pepc*基因水稻在光氧化、高温和干旱胁迫下具有相对较高的光合速率，叶绿素含量和成份衰减缓慢，较低的活性氧产生速率，维持较稳定的PSII活性，表现出耐光氧化的特性[7,17-22]。近年来的研究表明：干旱胁迫诱导PC引发多种信号转导机制，如Ca^{2+}(Calcium ion)、H_2O_2(Hydrogen peroxide)、NO(Nitric oxide)和ATP(Adenosine triphosphate)信号等[20-21,23]，而且PC能够通过下游依赖性的蛋白激酶调控相关基因包括干旱诱导转录因子基因*NAC6*、*bZIP60*以及干旱诱导蛋白激酶基因*CPK4*、*CPK9*、*SnRK1A*、*OsK24*和*OsK35*等[21,24-26]。干旱胁迫能够快速诱导水稻干旱相关转录因子和蛋白激酶表达，通过调控抗旱基因表达，磷酸化和去磷酸化调控机制，响应干旱胁迫[27]。

光合产物的运输与分配对植物体的生长发育具有重要的作用，是决定作物生长发育的重要生理过程。之前的研究证实在C_3植物叶肉细胞中具有C_4微循环的运转，并且C_3植物水稻中PEPC是C_4微循环中的限速酶[28]。而二氯苯基二甲基脲(3-(3’,4’-dich-lorophenyl)-1,1-dimethyl µrea, DCMU)是一种除草剂(敌草隆)，也是一种电子传递抑制剂，可以阻断类囊体膜上的电子传递，从而抑制光合作用。它抑制从PSⅡ上的Q向PQ的电子传递，从而可能抑制碳水化合物的累积。由于C_4途径比C_3途径要消耗更多的能量，DCMU可以结合在光反应中心D_1蛋白的Q_B位点上，阻止Q_B的还原，从而阻断电子传递，进而抑制光合作用[29-30]。

蔗糖作为光合产物的主要形式，而且众所周知，在逆境条件下合成的碳更容易向次生代谢物转化，其中花青素是重要的抗氧化分子，有助于保护植物免受ROS(Reactive oxygen species)的损害[31]。在许多植物物种中，尤其是在逆境条件下，花青素的积累受糖和光信号传导正调节。如Suc是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗中花青素生物合成最有效的诱导剂，其他糖和渗透物质效果较差或无效[32]。在拟南芥中Suc特异性信号通路可进一步刺激果聚糖和花青素的产生，而且Suc特异性诱导青素生物合成是需要MYB75 / PAP1等转录因子基因的参与[32], MYB型转录因子在其生物合成中具有中心作用且其还严格依赖于Ca^{2+} [33]; 小麦R2R3-MYB蛋白PURPLE PLANT1(TaPL1)作为花青素生物合成的正调节子[34]。已有研究表明SnRK激酶能够通过感知Ca^{2+}，NO和ABA等信号激活，从而通过MYB等转录因子调节花青素的合成[35-38]。但在水稻中糖是否诱导花青素生物合成以及参与信号的调节机制还不明确。但我们可以从高表达转玉米C_4-*pepc*水稻前期研究中获得一些线索，如本文之前的研究已经表明该材料耐旱，且在PEG 6000模拟干旱处理下，PC水稻中Suc含量显著被上调，除此此外，我们实验室之前在植株水平和细胞水平均证实其耐旱的响应过程依赖于细胞内的钙离子[39-40]。本研究选取干旱耐性以及光合能力差异明显的高表达转玉米C_4-*pepc*基因水稻(PC)和未转基因的野生型水稻(WT)为材料，在供试材料的4~5叶期，采用50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ DCMU根吸入预处理1 h，并采用12% PEG-6000对稻苗进行模拟干旱处理，解析光合、糖和花青素参与PC水稻的干旱响应，探究碳水化合物的积累和花青素合成之间的联系，从而解析高光效和抗逆之间的协调关系，期望更多地了解C_4-*pepc*在水稻中缓解干旱胁迫的生理功能，为“C_4稻”在干旱中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验以高表达转玉米C_4-*pepc*基因水稻(PC)[5]和野生型水稻Kitaake(WT)为试验材料。所选材料种子首先使用75%的酒精洗涤浸泡5 min，然后用50%次氯酸钠溶液浸种消毒15 min，随后使用蒸馏水反复冲洗数次直至无次氯酸钠残留。将种子置于30 ℃、黑暗条件下4 d，然后使用国际水稻所(International Rice Research Institute)营养液配方进行培养[41]。待水稻长到五至六叶期，于晴天傍晚选择株型、长势、叶片均一的植株进行处理，并统一测定生理指标。

1.2 DCMU预处理和模拟干旱胁迫处理

参照Qian等[40]的方法，将所有植株分3组，每组30株，重复3次：一组加入等量含50 $\mu mol \cdot L^{-1}$光合电子传递抑制剂DCMU溶液的营养液，预处理1 h，再加入含12% PEG-6000的营养液处理2 h；一组加入

营养液，再加入含 12% PEG-6000 的营养液处理 2 h；另一组只加入营养液。在处理结束选取倒 2 叶，快速进行样品采集，用液氮速冻后，立即置于-80 ˚C 储存备用。

1.3　光合参数的测定

参照 Li 等[23]的方法，采用美国 LI-COR 公司生产的 LI-6400 便携式光合测定仪，利用仪器自带的红蓝光源，大气 CO_2 浓度 400 μmol·mol^{-1}，光量子通量密度(photosynthetic photon quanta flux density, PPFD)800 μmol·m^{-2}·s^{-1}，流速设定为 500 μmol·s^{-1}，叶室温度设置为 25 ℃。室内温度控制在 25~30 ℃，在各处理处理结束时取植株的倒 2 叶在 800 μmol·m^{-2}·s^{-1}，测定其净光合速率(net photosynthesis rate, P_n)、气孔导度(stomatal conductance, G_s)、胞间 CO_2 浓度(Intercellular CO_2 concentration, C_i)及羧化效率(carboxylation efficiency, CE)等指标，每个处理 30 株，每次随机选择测量 4 次，重复 3~5 次。

1.4　叶片相对含水量(relative water content, RWC)的测定

使用打孔器在供试材料倒 2 叶的中间 1/3 处打取直径为 0.5 cm 的叶圆片 10 片，　称其鲜重(fresh weight, FW)；然后将叶圆片悬浮于装有蒸馏水的培养皿中，4 ℃黑暗下处理 18 h，称饱和鲜重(turgid fresh weight, TW)，最后将叶圆片于 105 ℃杀青 15 min，然后置于 75 ℃下烘至恒重。最后用千分之一天平称其干重(dry weight, DW)。相对含水量(relative water content, RWC)按照如下公式计算：RWC(%)=(FW–DW)/(TW–DW)×100%。

1.5　可溶性糖及各糖组分含量的测定

糖组分和含量测定参照 Ambavaram 等[42]的方法进行。可溶性糖、蔗糖、葡萄糖、果糖含量分别在 620 nm, 290 nm, 505 nm and 285 nm 测定吸光值。

1.6　花青素含量的测定

花青素含量的测定参照 Rabino 和 Mancinelli[43]的方法进行，分别在 530 nm、657 nm 处测定吸光值，花青素含量的计算则通过 A_{530}-A_{657} 计算。

1.7　一氧化氮(NO)含量的测定

水稻叶片 NO 浓度的测定参照 Murphy 和 Noack 等[44]的方法。

1.8　过氧化氢(H_2O_2)含量的测定

水稻叶片 H_2O_2 浓度的测定参照 Ren 等[10]的方法。

1.9　钙离子(Ca^{2+})含量的测定

水稻叶片 Ca^{2+}含量测定参照 Yang 等[45]方法。

1.10　磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)活性的测定

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC, EC 4.1.1.31)酶活性测定参考 Qian 等[39]的方法。粗酶液提取，取 0.15 g 叶片置于研钵冰浴研磨，其中加入 1.5 mL 粗酶提取缓冲液[50 mmol·L^{-1}Tris-HCl(三(羟甲基)氨基甲烷(pH 7.8)], 5 mmol·L^{-1} 二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT), 1 mmol·L^{-1} 氯化镁($MgCl_2$), 2%聚乙烯吡咯烷酮(*m*/*v*))，在 4 ℃下 12 000 rpm 离心 10 min，收集上清液，即为粗酶液。

酶活性测定反应体系(1 mL)：700 μL 蒸馏水，50 mmol·L^{-1} Hepes-KOH(pH 8.0), 5 mmol·L^{-1} $MgCl_2$, 10 mmol·L^{-1} 碳酸氢钠, 0.2 mmol·L^{-1} 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide ade-nine dinucleotide, NAD), 1.5 U 苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase), 150 μL 粗酶液, 5 mmol·L^{-1} 磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP), 将上述试剂摇匀后，使用 UV-1200 紫外分光光度计，在 340 nm 处记录吸光度的变化值，计算酶活性。

1.11　总 RNA 的提取和实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative real-time (Polymerase chain reaction, PCR), QRT-PCR)

根据先前报道的 Jung 等的试验方法制备总 RNA[46]。反转录参考 Chen 等[47]的方法，在 PCR 仪(ETC811, 北京东胜创新生物科技有限公司)上进行。根据制造商的说明书使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa Biotechnology(大连)有限公司)，进行 QRT-PCR 分析。使用 Applied Biosystems Step One TM 实时 PCR 系统(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)进行分析。QRT-PCR 的反应条件依次在 95 ℃ 10 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 40 s 和 68 ℃ 1 min 进行，共 32 个循环。每个实验重复三 3 次。表 1 中列出的引物对。引物在 Primer 3 上设计，以水稻组成性表达的 *ACTIN* 基因为内部参照，引物序列如下：

表 1　QRT-PCR 的基因和引物

Table 1　Genes and primers for QRT-PCR

Genes		Primers sequence	
Gene description	Primers name	Forward primer (F)	Reverse primer (R)
	ACTIN	CCCTCTTTCATCGGTATGGA	TTGATCTTCATGCTGCTTGG

bHLH	*B1*	GGATGGTCTCCTTGGACTGA	GGGTGGCAGATTCATCACTT
MYB	*B2*	GTGGCAATAACGACGACGACTCC	CGTACGGTGTTGACGAGGTA
Anthocyanin synthase	*C1*	CGGGTTCTTCTTCCACGAC	CCCGCAACTGCACTTAAAAT
	PAL	CAAGCTCATGACCTCCACCTA	GTTCATGGTGAGCACCTTCTT
gene	*CHS*	TCATGTATGGGTGGTTTGGTT	GCCAGGCATCTCTTACACAGG
	CHI	CGAGCAGTACTCGGACAAGG	TGAAGGCCTCCTTGAACTTG
	F3H	GAGCAATGGGAGGTTCAAGA	CTTCGATTTTCGACGGAAGA
Transcription factor	*F3'H*	CCGCTACAGTACCAGCCTTC	TGCCACCATTTCTAGAGTTCC
	DFR	CGGATGGATGTACTTCGTGTC	CATCCCGTTGCTGATGAAG
	ANS	CTCCTCCAGCTCAAGATCAAC	GTTGTGGAGGATGAAGGAGAG
	COP1	ATAATCCTGGGTCGAGCCAC	TATGGTGATCAGCAGAACCCAC
	HY5	GGCGGGTGCCGGAGATGG	CGCCGTCGTGTTCTTCTTGAGTATCTGG

1.12 数据分析

使用 SPSS18.0 软件对数据进行 One-Way ANOVA 分析，采用 Excel2013 对数据进行描述和作图。QRT-PCR 数据使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 DCMU 处理对干旱胁迫下转 C_4-*pepc* 水稻相对含水量及 PEPC 酶活性的影响

图 1A 显示，在正常条件下，WT 和 PC 水稻相对含水量没有显著差异，使用 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 2 h，两种供试材料的相对含水量均显著下降，PC 显著高于 WT；而 DCMU 联合 12% PEG-6000 处理进一步显著下调两种供试材料的相对含水量，且 PC 显著仍高于 WT (图 1A)。

植物 *pepc* 基因在应对逆境胁迫中具有重要的作用，高温、干旱以及盐胁迫都会导致 PEPC 酶活性及基因表达显著增加[8,11,48]。从图 1B 来看，在 12% PEG-6000 处理下 PC 水稻中 PEPC 酶活性始终显著高于 WT，且 DCMU 联合 12% PEG-6000 处理会显著降低 PC 水稻中 PEPC 酶活性，而 WT 水稻中 PEPC 活性在各处理中无显著变化(图 1B)。

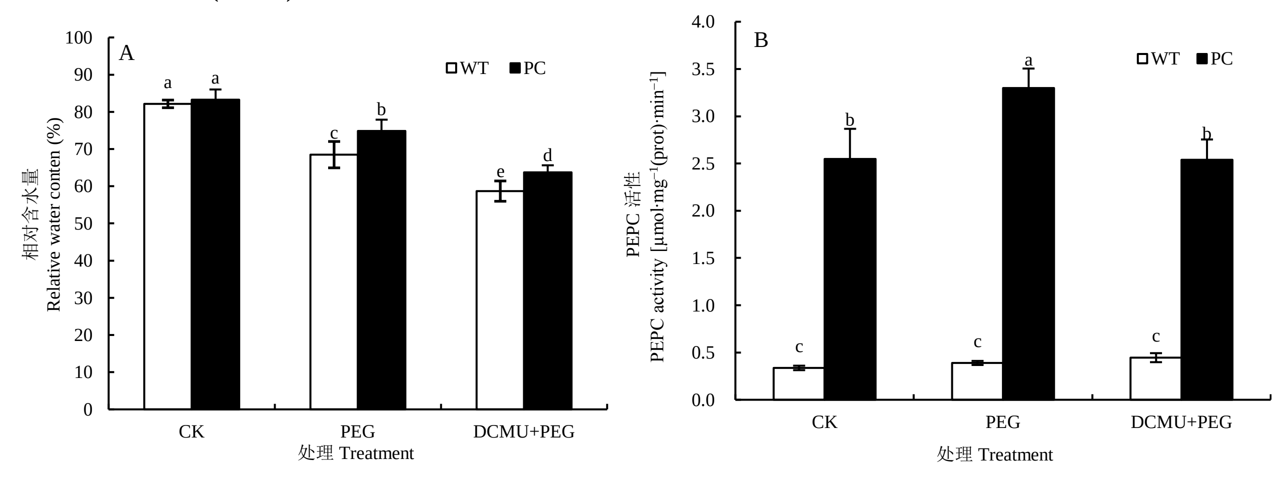


图 1 DCMU 预处理对模拟干旱胁迫下水稻叶片相对含水量(A)和 PEPC 活性(B)的影响

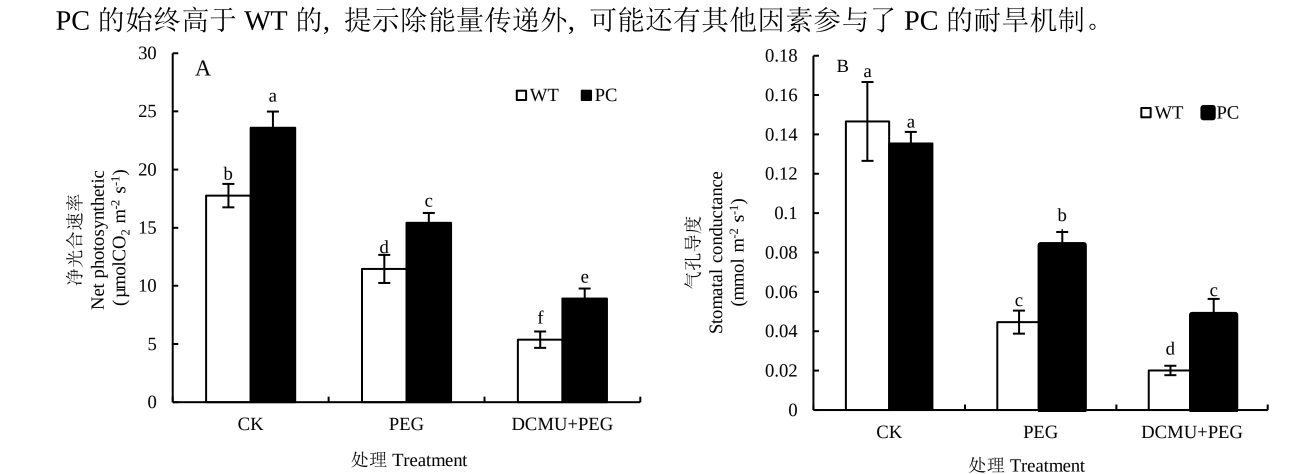
Fig. 1 Effects of DCMU pretreatment on the relative water content (A) and PEPC activity (B) under simulated drought stress

小写字母表示数据间差异显著($P<0.05$, LSD test。Data are mean ± SE from measurements of at least three independent replicates. Different letters indicate significant difference among data at $P < 0.05$.

2.2 DCMU 处理对干旱胁迫下转 C_4-*pepc* 水稻光合气体交换参数的影响

如图 2A-D 所示，相比正常条件下，12% PEG-6000 模拟干旱胁迫均显著降低了 PC 与 WT 水稻的净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 以及羧化效率，并且 PC 与 WT 之间存在显著差异 ($P<0.05$)，如干旱胁迫下，PC 水稻中净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 及羧化效率显著高于 WT。同时，DCMU 联合 12% PEG-6000 处理进一步下调 PC 与 WT 水稻的净光合速率、气孔导度和羧化效率，且 PC 显著高于 WT($P<0.05$)(图 2A、B、D)，而胞间 CO_2 无显著性变化(图 2C)，说明 DCMU 根部吸入预处理使供试水稻的光合参数均显著下降，而

PC 的始终高于 WT 的，提示除能量传递外，可能还有其他因素参与了 PC 的耐旱机制。



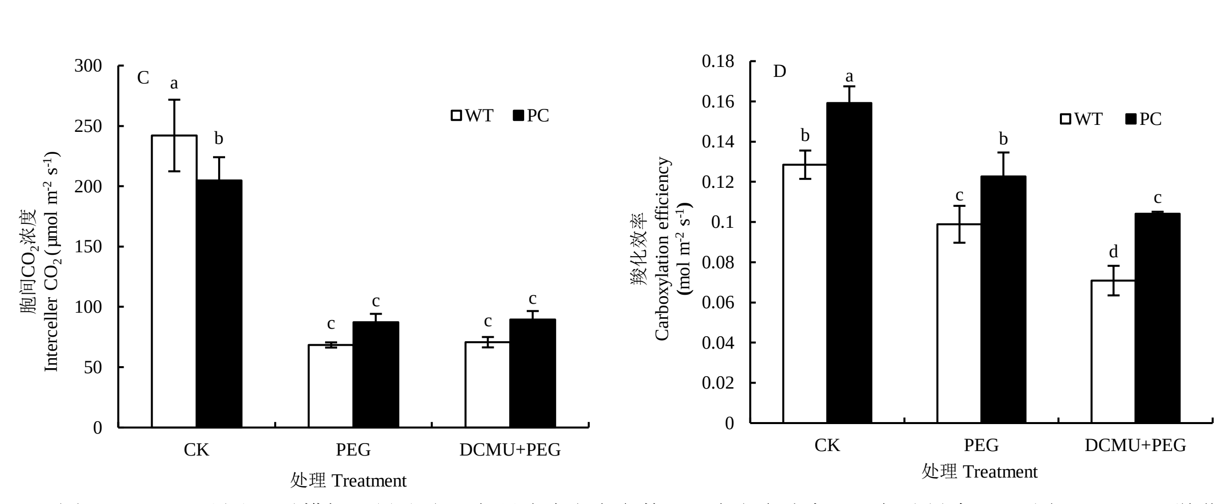


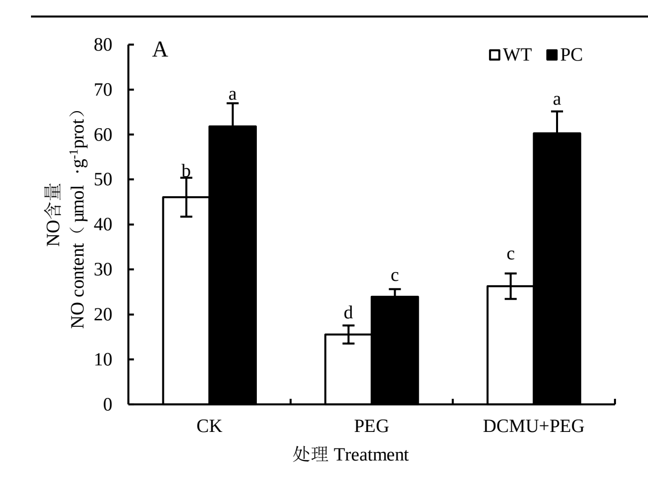
图 2　DCMU 预处理对模拟干旱胁迫下水稻叶片光合参数(A: 净光合速率 B: 气孔导度 C: 胞间 CO_2 D: 羧化效率)的影响

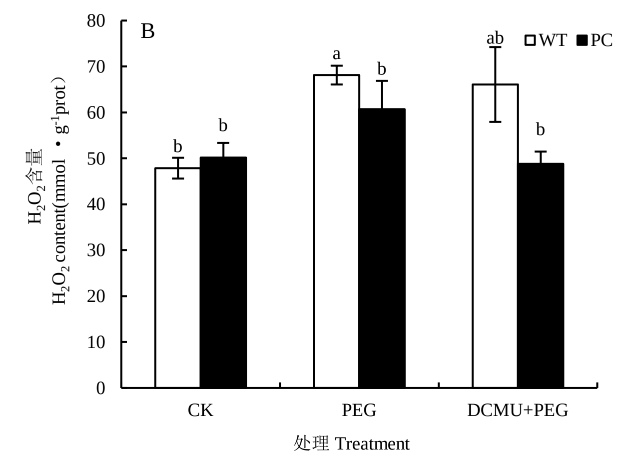
Fig. 2　Effect of DCMU treatment on photosynthetic parameters (A: net photosynthetic rate B: stomatal conductance C: Intercellular CO_2 D: carboxylation efficiency) of simulated drought stress

小写字母表示数据间的差异显著(P<0.05, LSD test)。Data are mean ± SE from measurements of at least three independent experiments with different letters indicate significant difference at P < 0.05.

2.3　DCMU 处理对干旱胁迫下转玉米 C_4-*pepc* 水稻信号分子的影响

在信号转导通路中, NO, H_2O_2 和 Ca^{2+}都是植物中重要的信号分子[24,49]。由图 3A 可知, NO 含量在正常情况下 PC 显著高于 WT, 使用 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 2 h 的水稻幼苗, PC 与 WT 中 NO 含量均显著下降，但 PC 仍显著高于 WT; 而 DCMU 联合 12% PEG-6000 处理则显著上调两种供试材料的 NO 含量, 其中 PC 的恢复到未处理的对照水平，而 DCUMU 处理下 WT 的含量仍显著低于 WT 未处理的，且 PC 仍显著高于 WT；而在各处理条件下, PC 水稻中 H_2O_2 含量始终低于 WT(图 3B)。从图 3C 可知, DCMU 联合 12% PEG-6000 处理上调两种供试材料中 Ca^{2+}含量，且 PC 均显著高于 WT。可见，与单独 PEG-6000 模拟干旱胁迫相比, DCMU 处理能够启动信号分子参与抗旱，其中 PC 的变幅更为显著。





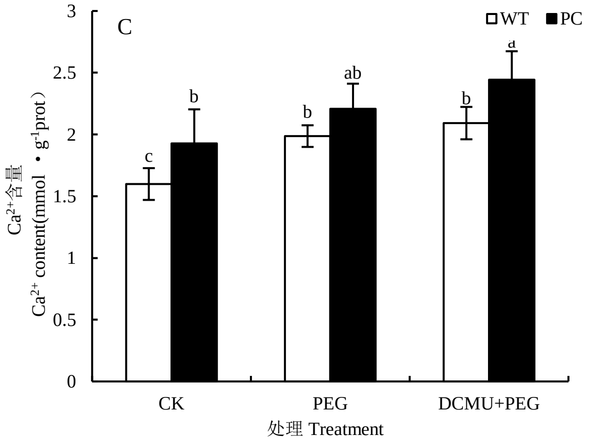


图 3　DCMU 预处理对模拟干旱胁迫下水稻叶片 NO, H_2O_2 和 Ca^{2+}的影响

Fig. 3　Effect of DCMU treatment on NO, H_2O_2 and Ca^{2+} under simulated drought stress

不同小写字母表示数据间的差异显著(P<0.05, LSD test)。Data are mean ± SE from measurements of at least three independent experiments with different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

2.4　DCMU 处理对 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫下转玉米 C_4-*pepc* 水稻可溶性糖和糖组分的影响

可溶性糖含量在干旱胁迫条件下的积累一方面有利于细胞渗透压的维持，另一方面还可以作为糖信号调节其耐旱性[50]。干旱处理显著上调供试材料的可溶性糖含量，但 WT 和 PC 之间无显著性差异(图 4A)。如图 4B 所示，正常情况下 PC 水稻中蔗糖含量显著高于 WT，使用 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 2 h 的水稻幼苗，均显著增加了 WT 和 PC 中蔗糖含量，且 PC 显著高于 WT; DCMU 联合 12% PEG-6000 处理显著下调两种供试材料的蔗糖含量，但仍未消除 2 材料的差异，PC 仍高于 WT(图 4B)。此外，模拟干旱处理也显著上调了供试材料中葡萄糖和果糖含量，但 DCMU 处理对其没有影响，而且两供试材料之间没有显著差异(图 4C、D)。这些结果提示 DCMU 处理不仅影响了电子传递的能量，而且影响了物质代谢(可溶性糖的变化)。尤其是总可溶性糖和蔗糖的含量的变化与光合参数的变化类似。

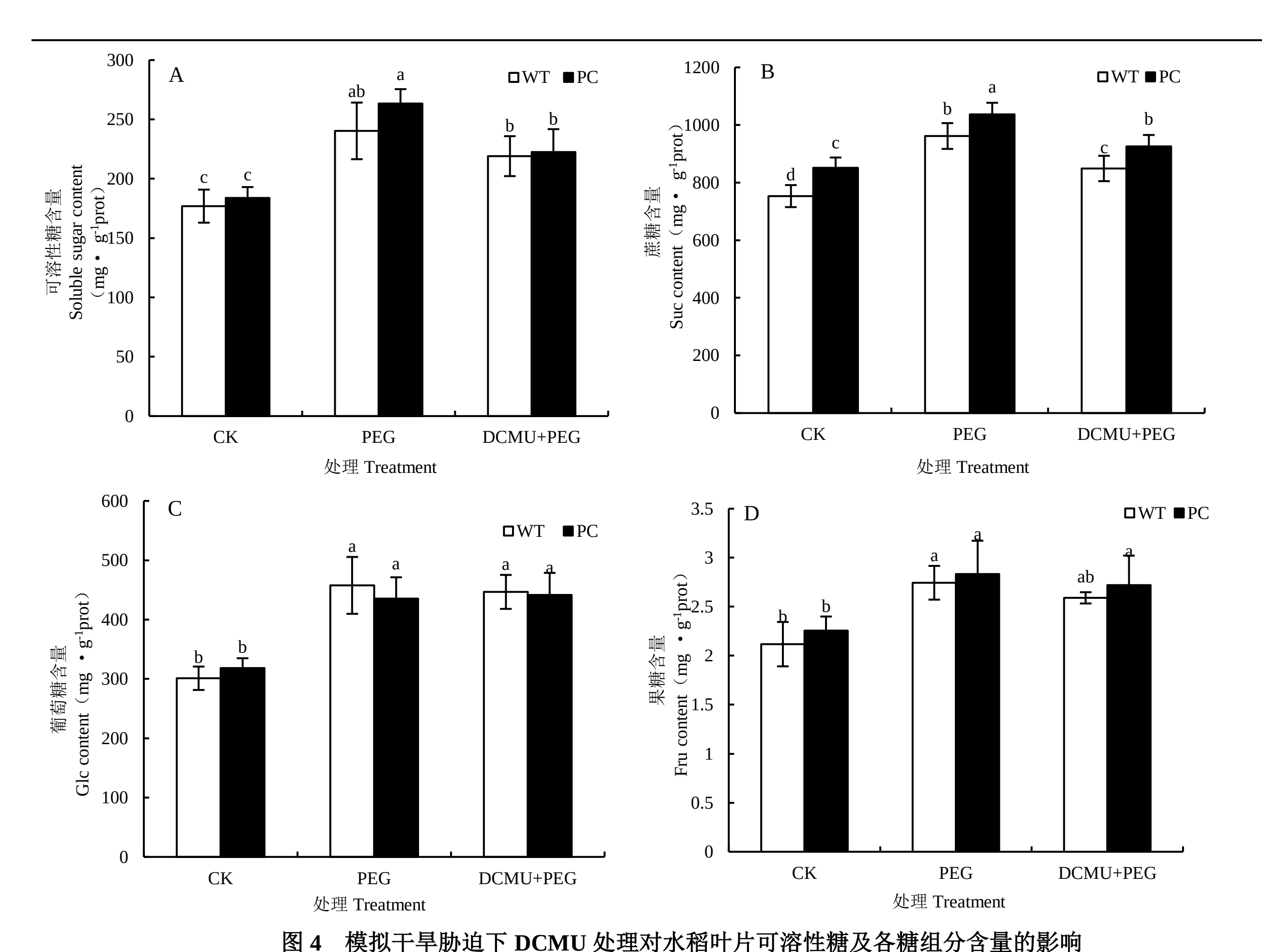


图 4　模拟干旱胁迫下 DCMU 处理对水稻叶片可溶性糖及各糖组分含量的影响

Fig. 4　Effect of DCMU treatment on soluble sugar and sugar content in PC and WT under simulated drought stresses

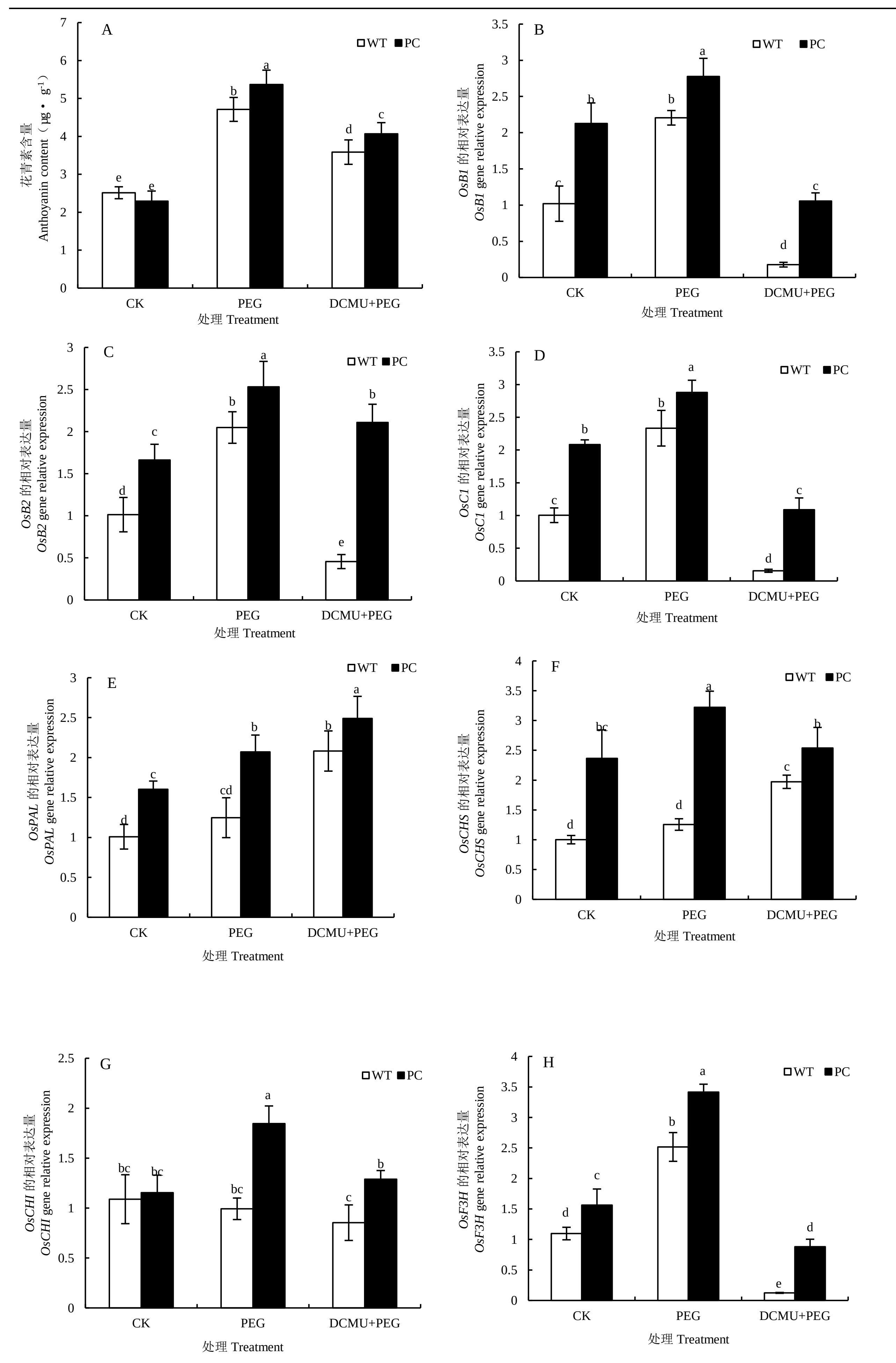
不同小写字母表示数据间差异显著(P<0.05, LSD test)。Data are mean ±SE from measurements of at least three independent experiments with different letters indicate significant difference at P < 0.05.

2.5　DCMU 处理对干旱胁迫下转玉米 C_4-*pepc* 水稻花青素含量及其合成酶基因表达的影响

虽然蔗糖对花青素合成的影响已有报道，但在干旱条件下光合抑制剂处理之后两者的关系几乎没有报道。在实验过程中，我们发现水稻花青素含量在使用 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理之后，其含量与对照相比显著上升，且 PC 高于 WT；而 DCMU 和 12% PEG-6000 联合处理显著下调两种供试材料的花青素含量，但 PC 仍显著高于 WT(图 5A)。那么干旱条件下，花青素代谢是如何调控的，两材料是否有差异，这是揭示两材料光合参数差异的关键。在水稻中，花青素的生物合成途径主要是苯丙氨酸途径。其生物合成的相关基因主要有调节基因和结构基因 2 种。调节基因 *OsB1* 和 *OsB2* 与水稻叶片颜色有关，*OsC1* 与水稻颖尖的颜色有关。而且，*OsB1* 和 *OsB2* 编码 bHLH 转录因子，*OsC1* 编码 R2R3-MYB 类转录因子，它们和花青素合成相关基因一起共同调节花青素在水稻中的积累[51]。结构基因指直接编码花青素生物合成相关酶的基因，主要有苯丙氨酸合成酶基因(*Phenylalnine ammonialyase, PAL*)，查尔酮异构酶基因(*Chalcone isomerase, CHI*)，查尔酮合成酶基因(*Chalcone synthase, CHS*)，黄酮-3-氢化酶基因(*Flavonoid-3-hydroxylase, OsF3H*)，黄酮-3'-氢化酶基因(*Flavonoid-3'-hydroxylase, F3'H*)，二氢黄酮醇还原酶基因(*Dihydroflavonol-4-reductase, DFR*)，花青素还原酶基因(*Anthocyanidin reductase, ANR*)，花青素合成酶基因(*Anthocyanidin synthase, ANS*)[52]。我们进一步研究了 12% PEG-6000 处理和 PEG-6000 与 DCMU 联合处理分析花青素合成基因的变化情况。

图 5B-D 显示，*OsB1*、*OsB2* 和 *OsC1* 在 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理下表达量均显著上升，且 PC 的表达量显著高于 WT；而 DCMU 与 12% PEG-6000 联合处理下两种供试材料的 *OsB1*、*OsB2* 和 *OsC1* 表达量下调，但 PC 仍显著高于 WT(图 5B-D)。

如图 6E-K 所示，正常条件下，PC 中 *OsPAL*、*OsCHS*、*OsF3H*、*OsF3'H*、*OsDFR* 和 *OsANS* 表达量均高于 WT(除 *OsCHI*)；在 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理下，PC 中 *OsPAL*、*OsCHS*、*OsCHI*、*OsF3H*、*OsF3'H*、*OsDFR* 和 *OsANS* 表达量均显著上升；而 DCMU 与 12% PEG-6000 联合处理后其表达量显著下降(除 *OsPAL*)，但 PC 始终高于 WT。总体而言，在干旱条件下 PC 水稻中花青素合成相关基因更高的转录水平有利于合成更多的花青素。



A
□WT ■PC
花青素含量
Anthoyanin content（μg• g-1）
7
6
5
4
3
2
1
0
e e
b a
d c
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
B
□WT ■PC
OsB1 的相对表达量
OsB1 gene relative expression
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
c b
b a
d c
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
C
□WT ■PC
OsB2 的相对表达量
OsB2 gene relative expression
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
d c
b a
e b
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
D
□WT ■PC
OsC1 的相对表达量
OsC1 gene relative expression
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
c b
b a
d c
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
E
□WT ■PC
OsPAL 的相对表达量
OsPAL gene relative expression
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
d c
cd b
b a
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
F
□WT ■PC
OsCHS 的相对表达量
OsCHS gene relative expression
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
d bc
d a
c b
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
G
□WT ■PC
OsCHI 的相对表达量
OsCHI gene relative expression
2.5
2
1.5
1
0.5
0
bc bc
bc a
c b
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment
H
□WT ■PC
OsF3H 的相对表达量
OsF3H gene relative expression
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
d c
b a
e d
CK
PEG
DCMU+PEG
处理 Treatment

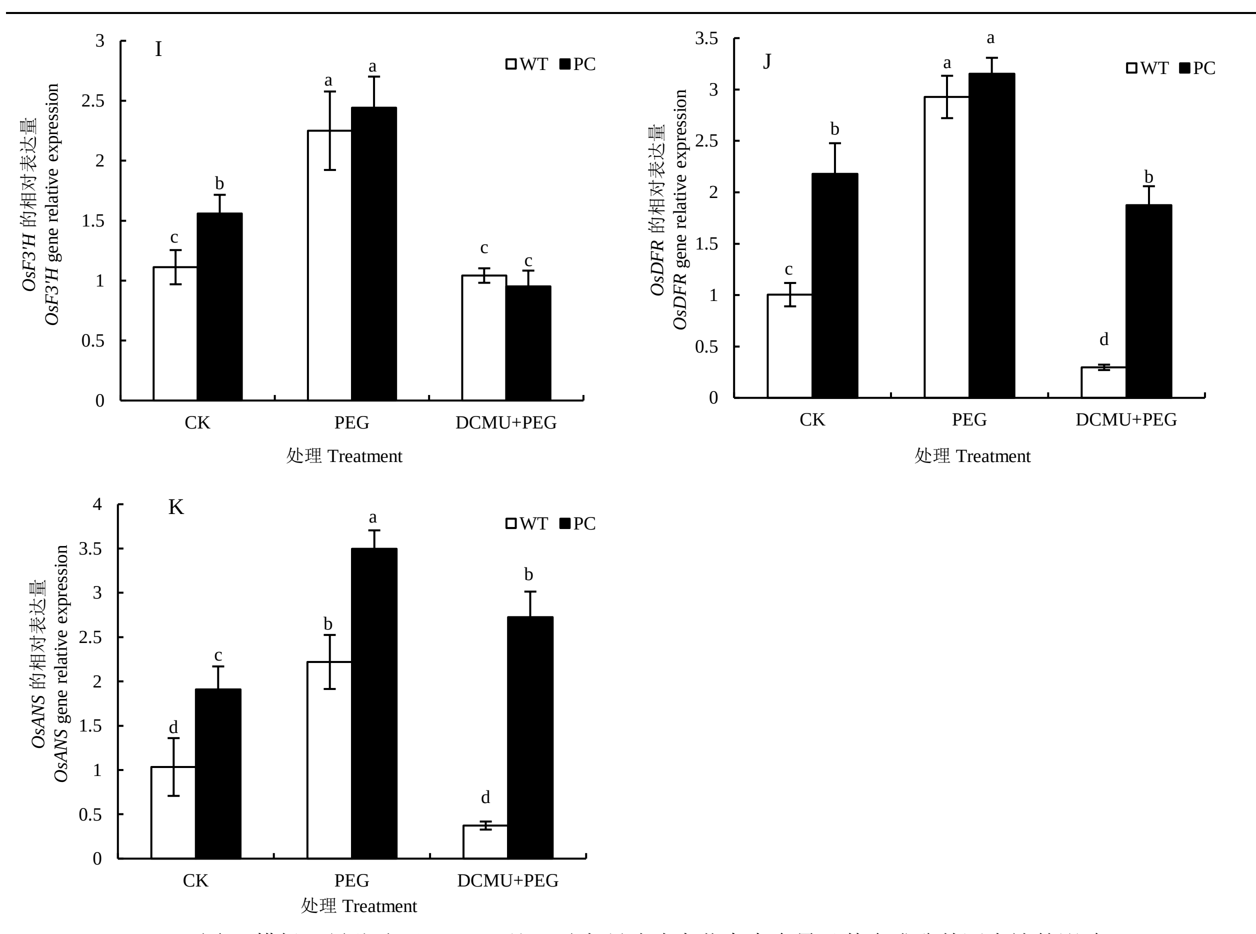


图 5 模拟干旱胁迫下 DCMU 处理对水稻叶片中花青素含量及其合成酶基因表达的影响

Fig.5 Effect of DCMU treatment on anthocyanin content and the expression of its synthase gene under simulated drought stress

不同小写字母表示数据间的差异显著(P<0.05, LSD test)。Data are mean ±from measurements of at least three independent experiments with different letters indicate significant difference at P < 0.05.

2.6　DCMU 处理对干旱胁迫下转玉米 C_4-*pepc* 水稻花青素调节因子的影响

供试材料在模拟干旱条件下，在转录水平上引起花青素调节和合成相关基因的表达差异，结合本研究观察到第二信使分子 NO 含量分析的变化，提示可能存在涉及花青素靶基因上游转录因子的变化。已经有研究表明：除了 MBW(MYB-BHLH-WD40)转录因子以外，已知 COP1(constitutively photomorphogenic 1)和 HY5(elongated hypocotyl 5)也是花青素调节中的两个重要的转录因子[53-54]，为此，在本研究中进一步分析了其基因的表达。由图 6A 可知，在正常情况下，PC 中 *OsCOP1* 显著高于 WT；12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理下，两种供试材料的 *OsCOP1* 均显著升高，且 PC 显著高于 WT；而 DCMU 和 12% PEG-6000 联合处理下调了两种供试材料的 *OsCOP1* 表达量，且 PC 显著仍高于 WT。在正常条件下，两种供试材料的 *OsHY5* 表达量无显著差异，在 12% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理下，PC 中 *OsHY5* 显著上升，且 PC 显著高于 WT；而 DCMU 和 12% PEG-6000 联合处理下调 PC 的 *OsHY5* 表达量，但 PC 仍显著高于 WT(图 6B)，综上，在干旱条件下，PC 可能通过第二信号分子 NO 和 Ca^{2+}的信号传导过程，诱导了转录因子的变化，从而增强花青素的积累。

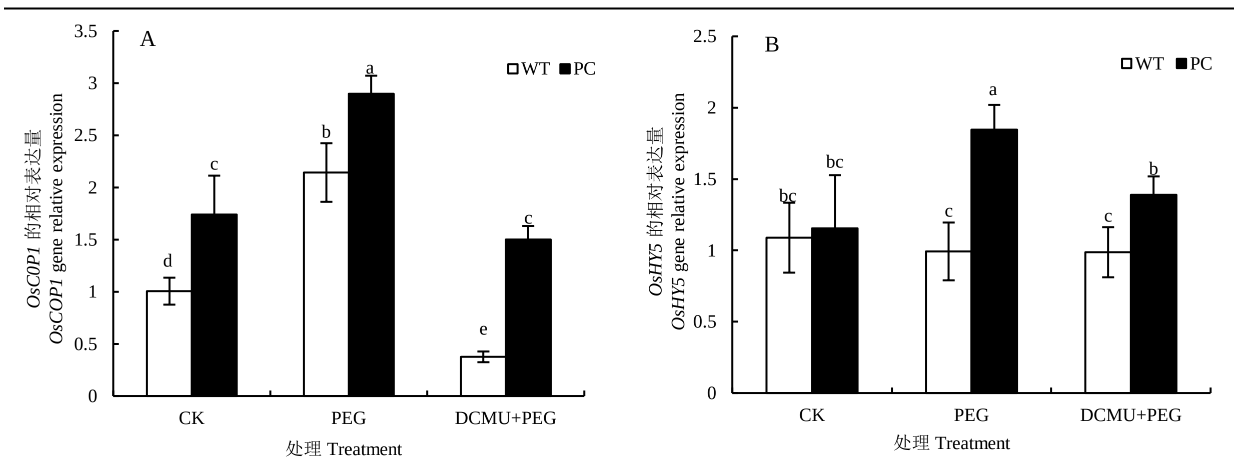


图 6　模拟干旱胁迫下 DCMU 处理对 PC 和 WT 叶片中花青素调节因子的影响

Fig.6 Effect of DCMU treatment on regulators of anthocyanin under simulated drought stress

不同小写字母表示数据间的差异显著(P<0.05, LSD test)。Data are mean ± SE from measurements of at least three independent experiments with different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

3　讨论

在水稻生长过程中会遭受到各种环境胁迫，例如高温、高光、干旱、盐和生物胁迫等影响。干旱胁迫引起气孔关闭，叶肉可利用的 CO_2 降低，碳同化速率降低，叶片吸收的光能过剩，造成光合器官的光化学效率及光合速率降低，发生光抑制甚至光破坏，导致作物光合能力降低，最终导致作物减产[55]。光合机构对干旱造成的水分胁迫有一定的耐受性，通过光呼吸和热耗散增加等许多途径耗散掉多余的激发能，以有效缓解光合作用中光抑制所产生的不良影响，从而形成多种保护机制[56]。

在气孔开放期间，高表达转玉米 C_4 型 *pepc* 基因水稻的保卫细胞中 PEPC 可特异性调控导致苹果酸或草酰乙酸积累，促进气孔开放，增强光合作用[5]。而在 3,3-二氯-二羟基膦酰基-甲基-2-丙烯酸酯(DCDP, 3,3-dichloro-2-dihydroxyphosphinoyl-methyl-2-propenoate)(PEPC 的抑制剂)的存在下，可限制气孔开放[57-58]。而使用光合作用的抑制剂 DCMU 能够阻断 PSII 中 Q_A 和 Q_B 之间的电子流动，改变植株的能量状态而影响光合能力。已有研究表明，DCMU 对植株光合过程的影响是通过不同的光质而造成的，通过气孔对不同波长光的反应发现 DCMU 在红光下可以抑制光合作用的进行，然而在蓝光下却促进了光合作用[59]。在红光下，促进细胞向细胞质中提供 ATP，这些 ATP 被质膜上的 H^+-ATPase 利用形成质子泵和气孔张开[60]，可见，DCMU 是通过调节植物体内的能量状态而影响光合的。前期的研究已经观察到，在干旱胁迫条件下，PEPC 的高表达能够维持较高的 PSⅡ活性，与原种相比，也产生较高含量的 ATP，来维持净光合速率的稳定[13]。本试验进一步通过在模拟干旱胁迫条件下通过外源添加 DCMU 到高表达转 C_4-*pepc* 基因水稻植株，结果显示：PC 中净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 及羧化效率在 DCMU 处理之后仍显著高于 WT，且 DCMU 处理使得 PC 水稻中 PEPC 酶活性显著下降，但 PC 中 PEPC 酶活性始终高于 WT(图 1B)，提示两供试材料能量状态的差异是导致其干旱表现的重要原因，但还存在其他的机制。本研究观察到供试材料中总可溶性糖和内源蔗糖含量变化趋势与光合参数的类似(图 4A, 4B)。已有研究表明：在逆境条件下，蔗糖可参与诱导花青素的积累[61]。在多种植物中，花青素积累的组织特异性已被证明通过 R2R3-MYB、bHLH 和 WD40 转录因子 3 大类基因家族调节[30]。由 MYB、bHLH 和 WD40 所形成的三元复合体(MBW 复合体)，其功能已经在模式植物拟南芥中得到详细阐述。本文我们的研究涉及 MYB 和 bHLH 两个转录因子，其中 *OsC1* 编码 R2R3-MYB 类转录因子，*OsB1* 和 *OsB2* 编码 bHLH 转录因子，而且有文献表明 *OsB1* 和 *OsB2* 必需与 MYB 类转录因子互作才能发挥功能[62]。从结果来看 PC 水稻中 *OsC1*, *OsB1*, *OsB2* 在逆境条件下均显著高于 WT，而 DCMU 联合 12% PEG-6000 处理之后其转录水平显著下降，但 PC 始终显著高于 WT(图 5B-D)。而对于 WD40，已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、苜蓿(*Medicago sativa* L.)、甘薯(*Dioscorea esculenta* (Lour.) *Burkill* L.)等中报道过 WD40 类花色苷转录因子[18, 63]，其在水稻中到目前为止还尚未见报道。本研究表明：花青素的含量、花青素合成基因以及调节它的转录因子的表达也与蔗糖的变化相一致(图 4B；图 5A)，如 *OsB1*, *OsB2*, *OsC1*, *OsPAL*, *OsCHI*, *OsCHS*, *OsF3H*, *OsF3'H*, *OsDFR*, *OsANS*, *OsCOP1*, *OsHY5* 转录水平在模拟干旱条件下呈现出同步变化趋势(图 5B-K；图 6A-B)，我们提示蔗糖可能在转录水平上参与花青素的调节和合成基因的表达，这其中可能涉及信号传导的过程。有研究表明蔗糖与植物抗逆的调节与 Ca^{2+}、NO 以及 H_2O_2 等信号有非常密切的联系[31,38,64]，本研究的确也观察到两材料在不同的处理下，其第二信使分子含量的差异，其中 DCMU 处理对 NO 含量的影响最为显著，而且加剧了供试材料的差

异表现(图 3A)，提示 PC 可能通过 NO 参与蔗糖依赖的花青素积累的调节，有关信息还需要今后 NO 与花青素的直接证据验证。

已知植物花青素的合成是一个需光过程，在光条件下，光受体接收光信号，通过信号转导形成细胞内第二信使系统级联传递来调节包括花青素合成在内的光形态建成反应[65]。有研究表明: E3 泛素连接酶组成型光形态建成(COP1)是位于光受体下游一个光形态建成的抑制子，是一个光调控植物生长发育的分子开关。在暗条件下，COP1 抑制光反应。COP1/SPA 复合体与 MYB 调控因子互作调控花青素合成的结构基因的表达，从而影响花青素的合成[65]，此外，黑暗条件下植物光形态建成调控因子 COP1 积累在细胞核内，直接与碱性亮氨酸拉链(bZIP)类转录因子 HY5 相互作用，并被蛋白酶降解，负调控下游基因的表达；而在光下 COP1 从细胞核内转移到细胞核外，从而 HY5 在细胞核内积累，可特异结合于查尔酮合成酶基因 *CHS* 等光诱导基因启动子上，正调控相关基因的表达[66]。此为，本文还选择了转录因子 *OsHY5* 进行了研究[24,53]。从本文的结果可以看到，在 12% PEG-6000 模拟干旱条件下，在 PC 中 *OsCOP1* 和 *OsHY5* 的转录表达与 MYB 和 bHLH 转录因子呈现出一致的结果，在逆境条件下均显著高于 WT，而 DCMU 联合 12% PEG-6000 处理之后其转录水平显著下降，但 PC 始终显著高于 WT(图 6A、B)。同时，编码植物花青素的生物合成的 7 个基因中除 *OsPAL* 以外 *OsCHI*, *OsCHS*, *OsF3H*, *OsF3'H*, *OsDFR*, *OsANS* 与转录因子呈现出相一致的表达水平(图 5F-K)。

综上所述，在干旱条件下，PC 材料一方面可通过电子传递的能量差异应对干旱逆境，而且还可以通过内源蔗糖含量的差异，并通过第二信使 Ca^{2+}，NO 感受干旱信号，参与转录因子的调节(比如 *OsCOP1* 和 *OsHY5*)，进而参与花青素合成基因的调控，合成较多的花青素，从而增强 PC 水稻对干旱逆境的响应。

参考文献

[1] Chaves M M, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell[J]. Annals of botany, 2009, 103(4): 551-560

[2] Zhu X G, Long S P, Ort D R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield[J]. Annual review of plant biology, 2010, 61: 235-261

[3] Karki S, Rizal G, Quick W P. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C_4 pathway[J]. Rice, 2013, 6(1): 28

[4] O'Leary B, Park J, Plaxton W C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs[J]. Biochemical Journal, 2011, 436(1): 15-34

[5] Ku M S B, Agarie S, Nomura M, *et al*. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants[J]. Nature biotechnology, 1999, 17: 76-80

[6] Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, et al. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C_4-*PEPC*[J]. Biochimie, 2002, 84: 1127-1135

[7] Jiao D, Kuang T, Li X, et al. Physiological characteristics of the primitive CO_2 concentrating mechanism in *PEPC* transgenic rice[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2003, 46(4): 438-446

[8] Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, et al. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing *PEPC* gene cloned from maize[J]. Plant Science, 2007, 172(6): 1204-1209

[9] Lian L, Wang X, Zhu Y, et al. Physiological and photosynthetic characteristics of indica Hang2 expressing the sugarcane *PEPC* gene[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41: 2189-2197

[10] Ren C G, Li X, Liu X L, et al. Hydrogen peroxide regulated photosynthesis in C_4-*pepc* transgenic rice[J]. Plant physiology and biochemistry, 2014, 74: 218-229

[11] Ding Z S, Sun X F, Huang S H, et al. Response of photosynthesis to short-term drought stress in rice seedlings overexpressing C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase from maize and millet[J]. Photosynthetica, 2015, 53 (4): 481-488

[12] 钱宝云，刘小龙，李霞. 钙肥对不同内源钙含量水稻品种光合参数的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(3): 467-473
Qian B Y, Liu X L, L X. Photosynthesis of rice cultivars with various endogenous calcium contents in response to calcium fertilizer application[J]. Jiangsu journal of agricultural sciences, 2014, 30(3): 467-473

[13] 霍垲，陆巍，李霞. 干旱胁迫下调节 ATP 的含量对提高转玉米 C_4 型 *pepc* 水稻光合速率的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(5): 605-613
Huo K, Lu W, Li X. Effect of regulate the ATP content on improving the photosynthetic rate of transgenic rice plant with overpressing C_4-*pepc* from Maize under drought stress[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2015, 23(5): 605-613

[14] 唐玉婷，李霞，陆巍，等. 高表达转 C_4 型 *PEPC* 基因水稻在低氮下诱导碳氮酶稳定光合作用[J]. 华北农学报, 2015, 30(4): 95-100

Tang Y T, Li X, Lu W, et al. Transgenic rice with high expression of C_4-*PEPC* genes induced higher carbon and nitrogen key enzyme to maintain photosynthesis under low nitrogen conditions[J]. Acta agriculturae boreali-sinica, 2015, 30(4): 95-100
[15] Jiao D, Xia L I, Huang X, et al. The characteristics of CO_2 assimilation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in transgenic *PEPC* rice[J]. Science Bulletin, 2001, 46(13): 1080
[16] 朱素琴，季本华，焦德茂. 亚硫酸氢钠对转 *PEPC* 基因水稻叶片光合作用的促进作用[J]. 科技通报, 2004, 20(6): 523-528
Zhu S Q, Ji B H, Jiao D M. Promotive effect of $NaHSO_3$ on photosynthesis in *PEPC* transgenic rice leaves[J]. Bulletin of Science and Technology, 2004, 20(6): 523-528
[17] Biswal A K, Dilnawaz F, David K A V, et al. Increase in the intensity of thermoluminescence Q-band during leaf ageing is due to a block in the electron transfer from QA to QB[J]. Luminescence, 2001, 16(5): 309-313
[18] Suzuki K, Ohmori Y, Ratel E. High root temperature blocks both linear and cyclic electron transport in the dark during chilling of the leaves of rice seedlings[J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(9): 1697-1707
[19] Van den Ende W, El-Esawe SK. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses?[J]. Environmental and experimental botany, 2014, 108: 4-13
[20] Yoshida S, Forno D A, Cock J H. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice[M]. Philippines; International Rice Research Institute, 1976. pp 61–64
[21] Qian B Y, Li X, Liu X L, et al. Improved oxidative tolerance in suspension-cultured cells of C_4-*PEPC* transgenic rice by H_2O_2 and Ca^{2+} under PEG-6000[J]. Journal of integrative plant biology, 2015, 57(6): 534-549
[22] Li X, Wang C, Ren C G. Effects of 1-butanol, neomycin and calcium on the photosynthetic characteristics of *PEPC* transgenic rice[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10: 17466-17476
[23] Ambavaram M M R, Basu S, Krishnan A, et al. Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress[J]. Nature communications, 2014, 5
[24] Rabino I, Mancinelli A L. Light, temperature, and anthocyanin production[J]. Plant Physiology, 1986, 81(3): 922-924
[25] Qian B, Xia L, Liu X, et al. Enhanced drought tolerance in transgenic rice over-expressing of maize C_4, phosphoenolpyruvate carboxylase gene via NO and Ca^{2+}[J]. Journal of plant physiology, 2014, 175C: 9-20
[26] Jia X H, Zhang P P, Shi D J, et al. Regulation of *PEPC* gene expression in Anabaena sp. PCC 7120 and its effects on cyclic electron flow around photosystem I and tolerances to environmental stresses[J]. Journal of integrative plant biology, 2015, 57(5): 468-476
[27] Nomura H, Shiina T. Calcium signaling in plant endosymbiotic organelles: mechanism and role in physiology[J]. Molecular plant, 2014, 7(7): 1094-1104
[28] Yu X, Niu X L, Yang S H, et al. Research on Heat and Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) by Overexpressing Transcription Factor *OsbZIP60*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(20): 4142-4149
[29] Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. Plant Cell & Environment, 2013, 36(7): 1242-1255
[30] Loreti E, Povero G, Novi G, et al. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis[J]. New Phytologist, 2008, 179(4): 1004-16
[31] Zhang Y C, Gong S F, Li Q H, et al. Functional and signaling mechanism analysis of rice CRYPTOCHROME 1[J]. Plant Journal, 2006, 46(6): 971-983
[32] Shin D H, Choi M G, Kim K, et al. HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the *MYB75/PAP1* transcription factor in Arabidopsis[J]. Febs letters, 2013, 587(10): 1543-1547
[33] 丁在松，周宝元，孙雪芳等. 干旱胁迫下 *PEPC* 过表达增强水稻的耐强光能力[J]. 作物学报, 2012, 38(2): 285-292
Ding Z S, Zhou B Y, Sun X F, et al. High light tolerance is enhanced by overexpressed *PEPC* in rice under drought stress[J]. Acta Agronomica Sinica. 2012, 38(2): 285-292
[34] Santos M G, Ribeiro R V, Machado E C, et al. Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under mild water deficit[J]. Biologia Plantarum, 2009, 53(2): 229-236
[35] Doubnerová V, Ryšlavá H. What can enzymes of C_4, photosynthesis do for C_3, plants under stress?[J]. Plant Science, 2011, 180(4): 575-583
[36] Jiao D M, Li X, Ji B H. Photoprotective effects of high level expression of C_4, phospho enol pyruvate carboxylase in transgenic rice during photoinhibition[J]. Photosynthetica, 2005, 43(4): 501-508
[37] Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, et al. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica, rice expressing pepc, gene cloned from maize[J]. Plant Science, 2007, 172(6): 1204-1209
[38] 李霞，任承钢. ABA, BA 和 DPI 对高表达玉米 C_4-*PEPC* 水稻光合特性及叶绿素荧光特性的影响[J]. 植物生理学报, 2012,

48(6): 549-556

Li X, Ren C G. Effects on photosynthetic and fluorescence characteristics under treatments of ABA, BA or DPI in transgenic rice with over-expression C_4-*pepc* gene[J]. Plant physiology Journal, 2012, 48(6):549-556

[39] 李霞，吴爽，焦德茂等. 转 *PEPC* 基因水稻的选育[J]. 江苏农业学报, 2001, 17(3): 143-147

Li X, Wu S, Jiao D M, et al. Selection and breeding of the *pepc* transgenic rice[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences. 2001, 17(3): 143-147

[40] Liu X, Li X, Zhang C, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase regulation in C_4-*PEPC*-expressing transgenic rice during early responses to drought stress[J]. Physiologia Plantarum, 2017, 159(2): 178-200

[41] Huo K, Li X, He Y F, et al. Exogenous ATP enhance signal response of suspension cells of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) expressing maize C_4-*pepc* encoded phosphoenolpyruvate carboxylase under PEG treatment[J]. Plant Growth Regulation, 2017, 1-13

[42] Nakashima K, Tran L-SP, Nguyen, et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice[J]. Plant Journal, 2007, 51: 617-630

[43] Nijhawan A, Jain M, Tyagi A K, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice[J]. Plant Physiology, 2008, 146(2): 333-350

[44] Huang G T, Ma S L, Bai L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39: 969-987

[45] Vavasseur A, Raghavendra A S. Guard cell metabolism and CO_2 sensing[J]. New Phytologist, 2005, 16: 665-682

[46] Zhang C, Li X, He Y F, et al. Physiological investigation of C_4-phosphoenolpyruvate-carboxylase-introduced rice line shows that sucrose metabolism is involved in the improved drought tolerance[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, Doi: 10.1016/j.plaphy

[47] Agbariah K T, Rothbejerano N. The effect of blue light on energy levels in epidermal strips[J]. Physiologia Plantarum, 1990, 78(1): 100-104

[48] Tominaga M, Kinoshita T, Shimazaki K. Guard-Cell Chloroplasts Provide ATP Required for H^+ Pumping in the Plasma Membrane and Stomatal Opening[J]. Plant & Cell Physiology, 2001, 42(8): 795

[49] Meng L S, Li Y Q, Liu M Q, et al. TheArabidopsis ANGUSTIFOLIA3-YODAGene Cascade Induces Anthocyanin Accumulation by Regulating Sucrose Levels[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(e7386)

[50] Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, et al. The Purple leaf (Pl) locus of rice: The Plw allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis[J]. Plant & Cell Physiology, 2001, 42(9): 982-991

[51] Dong W, Niu L, Gu J, et al. Isolation of a WD40-repeat gene regulating anthocyanin biosynthesis in storage roots of purple-fleshed sweet potato[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(5): 1123-1132

[52] Tossi V, Amenta M, Lamattina L, et al. Nitric oxide enhances plant ultraviolet-B protection up-regulating gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway[J]. Plant Cell and Environment, 2011, 34(6): 909-921

[53] Sanyal SK, Kanwar P, Yadav A K, et al. Arabidopsis CBL interacting protein kinase 3 interacts with ABR1, an APETALA2 domain transcription factor, to regulate ABA responses[J]. Plant Science, 2017, 254: 48-59

[54] Yin R, Skvortsova M Y, Loubéry S, et al. COP1 is required for UV-B-induced nuclear accumulation of the UVR8 photoreceptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(30): E4415-E4422

[55] Srivastava A K, Senapati D, Srivastava A, et al. Short Hypocotyl in White Light1 interacts with Elongated Hypocotyl5 (HY5) and Constitutive Photomorphogenic1 (COP1) and promotes COP1-mediated degradation of HY5 during Arabidopsis seedling development[J]. Plant physiology, 2015, 169(4): 2922-2934